

Válasz dr. Matesz Klára professzor asszony bírálatára

Mindenek előtt szeretném megköszönni dr. Matesz Klára professzor asszonynak, hogy disszertációm bírálatát elvállalta, és azt pozitívan értékelte. Köszönöm, hogy elismeréssel nyilatkozott munkánk színvonaláról, annak elméleti és gyakorlati jelentőségéről. A dolgozatot érintő megjegyzésekre és kérdésekre az alábbiakban szeretnék válaszolni.

- A rövidítésjegyzék összeállítása során igyekeztem azt minél teljesebb körűre készíteni, ennek ellenére sajnálatos módon néhány rövidítés magyarázata kimaradt, és csak a szövegben került magyarázatra. A hiányosságért elnézést kérek, és csak remélni tudom, hogy ez nem befolyásolta nagyon a disszertáció érthetőségét.

- A professzor asszony hiányolja a neurovaszkuláris egység fogalmának leírását a bevezetésből. Valóban kíváncsi lettem volna a neurovaszkuláris egység fogalmának bevezetése már a vér-agy gát szerkezetének tárgyalása során. A szakirodalom egyre inkább egy funkcionális egységként kezeli a kapillárisok sejtjeit (endotélsejtek, periciták, asztrociták) és az idegsejteket (Abbott és mtsai., 2006), ami a köztük levő sokirányú kapcsolat és a patológiai folyamatokban játszott szerepük miatt teljesen indokolt.

Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Jan;7(1):41-53.

- Az aquaporinokkal kapcsolatos kérdésre adott válaszom a következő. Fiziológiai körülmények között az agyi endotélsejtek jelen ismereteink szerint nem expresszálnak aquaporinokat. Kimutatásukkal mi is próbálkoztunk RT-PCR segítségével – sikertelenül (nem publikált eredmények). A vér-agy gát szintjén az aquaporinok, elsősorban az AQP4 (Kobayashi és mtsai., 2001, Francesca és Rezzani, 2010), az asztrociták végtalpaiban helyezkednek el rozettaszerű struktúrákat alkotva, közel az endoteliális felszínhez, és kísérleti adatok arra utalnak, hogy agyi endotélsejtek jelenlétében fokozottabban expresszálódnak (Wolburg és mtsai., 2011). Patológiai körülmények között (pl. agyi iszkémia) szintén fokozódhat expressziójuk (Taniguchi és mtsai., 2000), és ennek szerepe lehet az agyödéma kialakulásában. Asztrocitákban AQP9-et is leírtak, ennek expressziója gliómában növekszik meg (Warth és mtsai., 2007).

Kobayashi H, Minami S, Itoh S, Shiraishi S, Yokoo H, Yanagita T, Uezono Y, Mohri M, Wada A. *Neurosci Lett.* 2001;297(3):163-6.

Francesca B, Rezzani R. Aquaporin and blood brain barrier. *Curr Neuropharmacol.* 2010;8(2):92-6.

Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, Mack AF. Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2011;287:1-41

Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, Tamatani M, Kobayashi A, Yokawa T, Maruno M, Kato A, Ohnishi T, Kohmura E, Tohyama M, Yoshimine T. Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;78(1-2):131-7.

Warth A, Mittelbronn M, Hülper P, Erdlenbruch B, Wolburg H. Expression of the water channel protein aquaporin-9 in malignant brain tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007;15(2):193-8.

- A vér-agy gát sejtjeinek esetleges regionális különbségeit érintő kérdéssel kapcsolatban a következőket szeretném megemlíteni. Az agyi endotélsejtek nem képeznek egy teljesen homogén populációt. Így például jelentős morfológiai és funkcionális különbségek vannak azon endotélsejtek között, amelyek olyan területen helyezkednek el, ahol szoros a vér-agy gát, és azon endotélsejtek között, amelyek egy relatív nyitott vér-agy gáttal rendelkező területeken vannak (circumventricularis organum). Itt az endotélium fenesztrált, és a szoros kapcsolatok sem képeznek folytonos fonatokat. Ugyanakkor különbségek vannak a kapillárisok, arteriolák és venulák endotélsejtjei között is. A kapillárisok szoros kapcsolatai a legkomplexebbek, itt 8-12 párhuzamos fonat figyelhető meg, ugyanakkor ez a fonat hálózat a posztkapilláris venulákban már kevésbé összetett. Az artériák endotélsejtjei között pedig a szoros kapcsolatok fonatai egy egyszerű hálózatot alkotnak (Nag, 2003). A nyitott vér-agy gáttal rendelkező területeken, mint amilyen az area postrema, az asztrociták is más morfológiával rendelkeznek: vakuólák figyelhetőek meg, kevesebb nyúlványuk van, és a végtaplak kevésbé szorosan fekszenek rá a kapillárisokra (Willis és mtsai., 2007).

Nag S. Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels. In: *The Blood-Brain Barrier. Biology and Research Protocols*. (Ed. Nag S.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 2003, p. 3-36.

Willis CL, Garwood CJ, Ray DE. A size selective vascular barrier in the rat area postrema formed by perivascular macrophages and the extracellular matrix. *Neuroscience*. 2007;150(2):498-509.

- A periciták szerepének kérdése egyre inkább előtérbe kerül a vér-agy gátra irányuló kutatások során. E sejtek számos biológiailag aktív molekulát képesek felszabadítani (TGF-béta, VEGF, bFGF, kemokinek), kontraktilis tulajdonságokkal is rendelkeznek, így fontos szabályozó szerepet töltenek be a vér-agy gát, illetve az azt alkotó sejtek működésében (keringés szabályozása, angiogenezis, endoteliális proliferáció). Ezen túlmenően, őssejt tulajdonságokkal is rendelkezhetnek (Armulik és mtsai., 2011). A közelmúltban megjelent két igen érdekes közlemény igazolja a periciták szerepét. Egyrészt megfigyelték, hogy az egészséges pericitával nem rendelkező egerek (PDGF-béta mutáns egerek) vér-agy gátja permeábilis vízzel szemben, de átereszt kis és nagy molekulásúlyú anyagokat is. A jelenség hátterben egy fokozott transzcitózis állhat. Másrészt a periciták vér-agy gát specifikus gének expresszióját szabályozzák az agyi endotélsejtekben, és elősegítik az asztrociták polarizációját is (Armulik és mtsai., 2010). A pericitáknak fontos szerepe van az embrionális fejlődés során is. Abban a periódusban, amikor még asztrociták nincsenek jelen, a periciták nélkülözhetetlenek olyan vér-agy gát tulajdonságok kialakulásában, mint a paracelluláris és transzcelluláris barrier (szoros kapcsolatok jelenléte, vezikula transzport szabályozása) (Daneman és mtsai., 2010).

Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*. 2011 Aug 16;21(2):193-215.

Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 2010;468(7323):557-61.

Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*. 2010;468(7323):562-6. Epub 2010 Oct 13.

- A professzor asszony hiányolta az 1-es és 2-es ábrák forrásának megjelölését. Az említett két ábra saját rajz, ezért nincs forrás megjelölve.

- A dystrophin és dystroglycan expressziójával kapcsolatos kérdésre a következőt szeretném válaszolni. A vér-agy gát sejtjeiben elsősorban az asztrociták expresszálnak dystroglycant illetve dystrophint. Elektronmikroszkópos vizsgálatok kiderítették, hogy az endotélsejteket körülölelő asztrocita végtalpak is tartalmaznak dystroglycant (Zaccaria és mtsai., 2001). Azonban a dystrobrevinről kimutatták, hogy nemcsak az asztrocita végtalpakban, hanem az endotélsejtekből is expresszálódik, ami arra utal, hogy a dystrophin komplexumnak szerepe lehet a vér-agy gát működésében (Ueda és mtsai., 2000). Ezen túlmenően az agyi endotélsejtek utrophint is expresszálnak (Haenggi és mtsai., 2004).

Zaccaria ML, Di Tommaso F, Brancaccio A, Paggi P, Petrucci TC. Dystroglycan distribution in adult mouse brain: a light and electron microscopy study. *Neuroscience*. 2001;104(2):311-24.

Ueda H, Baba T, Terada N, Kato Y, Fujii Y, Takayama I, Mei X, Ohno S. Immunolocalization of dystrobrevin in the astrocytic endfeet and endothelial cells in the rat cerebellum. *Neurosci Lett*. 2000;283(2):121-4.

Haenggi T, Soontornmalai A, Schaub MC, Fritschy JM. The role of utrophin and Dp71 for assembly of different dystrophin-associated protein complexes (DPCs) in the choroid plexus and microvasculature of the brain. *Neuroscience*. 2004;129(2):403-13.

- Milyenek az endotélsejtek közötti kapcsolatok, illetve jelen vannak-e junkcionális fehérjék azokon az agyterületeken, ahol nincs vér-agy gát?

Azokon az agyterületeken, ahol a vér-agy gát nyitottabb, az endotélsejtek közötti kapcsolatok jelentősen különböznek a szoros zárral rendelkező területek agyi endotélsejtjei közötti kapcsolatoktól: nem jellemző a szoros kapcsolatok jelenléte, vagy pedig a szoros kapcsolat fonatok („TJ strands”) nem folytonosak (Nag, 2003). Ennek ellenére ezen endotélsejtek junkcionális fehérjéket, mint általában az endotélsejtek, expresszálnak. Egérben, az eminentia mediana és a subfornicalis szerv ereiben egyáltalán nem sikerült ZO-1-et detektálni, azonban az area postrema és különösen a lamina terminalis organum vasculosumának erei expresszálnak ZO-1-et (Petrov és mtsai., 1994). Egy másik tanulmány szerint az area postrema endotélsejtjei nem expresszálnak occludint, claudin 5-öt és 12-t, ellenben gyenge claudin-1 festés megfigyelhető volt (Willis és mtsai., 2007).

Nag S. Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels. In: *The Blood-Brain Barrier. Biology and Research Protocols*. (Ed. Nag S.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 2003, p. 3-36.

Petrov T, Howarth AG, Krukoff TL, Stevenson BR. Distribution of the tight junction-associated protein ZO-1 in circumventricular organs of the CNS. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994;21(3-4):235-46.

Willis CL, Garwood CJ, Ray DE. A size selective vascular barrier in the rat area postrema formed by perivascular macrophages and the extracellular matrix. *Neuroscience*. 2007;150(2):498-509.

- A professzor asszony hiányolja annak leírását, hogy korábban milyen glutamát receptorokat mutattak ki a vér-agy gát sejtjein. A glutamát receptorok kimutatására irányuló kísérletsorozatunk előtt tudomásunk szerint nem írtak le glutamát receptor expressziót agyi endotélsejtekben, azonban voltak olyan kísérleti eredmények, amelyek utaltak jelenlétükre: pl. izolált kapillárisok kalcium és glükóz felvétele NMDA stimuláció hatására (Koenig és mtsai., 1992). Ezért maradt ki a glutamát receptorok bemutatása. A vér-agy gát felépítésében résztvevő asztrociták azonban expresszálnak glutamát receptorokat, így valóban célszerű lett volna egy rövid bemutatás.

Koenig H, Trout JJ, Goldstone AD, Lu CY. Capillary NMDA receptors regulate blood-brain barrier function and breakdown. Brain Res. 1992 Aug 21;588(2):297-303.

- Arra a kérdésre, hogy a két-háromhetes állatokból izolált endotélsejteken kapott eredmények mennyire feleltethetők meg a felnőtt állatból kapott eredményeknek, illetve vannak-e funkcionális vizsgálatok kéthetes vagy hasonló állatokban, a következőt szeretném válaszolni.

Az agyi endotélsejteket 2-3 hetes patkányokból izoláljuk, ebben a korban a vér-agy gát már jórészt kialakult (E16-os patkány embrió vér-agy gátja már nem ereszt át a plazmafehérjéket), és a tenyésztés során az endotélsejtek tovább érnek. Az így létrehozott endotél réteg barrier tulajdonságai jók, rendszeresen lehet 200 Ohm x cm² feletti transzendoteliális elektromos ellenállást mérni, ami tekintettel arra, hogy 120-130 Ohm x cm² érték felett a permeabilitás már nem csökken jelentősen (Gaillard és deBoer, 2000), alkalmassá teszi a modellt vér-agy gát vizsgálatokra. A módszer széles körben alkalmazott és elfogadott modellrendszernek mondható, bár mint minden modell, távolról sem tekinthető tökéletesnek. A felnőtt patkányokból izolált endotélsejtek proliferációs tulajdonságai rosszabbak, ezért általában fiatal, két-háromhetes állatokat szoktak használni, de vannak sikeres kísérletek, melyekben felnőtt állatokból történt az izolálás (Abbott és mtsai., 2012); ezen endotél rétegek permeabilitási tulajdonságai összevethetőek a fiatal állatokból nyert endotél réteg permeabilitásával.

A vér-agy gát teljes kifejlődése egy folyamat eredménye. Patkányban már az embrionális élet során kialakul egy meglehetősen jó zár funkcionális szoros kapcsolatokkal. Azonban ez még nem tekinthető teljesen érett barriernek, egyes anyagok még könnyebben áthatolhatnak rajta, és az érési folyamat még posztnatálisan is folytatódik. Ezen túlmenően az embrionális vér-agy gátban olyan transzport rendszerek is aktívak, amelyek a felnőtt szervezetben már nem, mint például egyes fehérje transzport rendszerek. A két-háromhetes állatok vér-agy gátja azonban már közel áll a felnőtt állatokéhoz (Saunders és mtsai., 1999, 2012).

Gaillard PJ, de Boer AG. Relationship between permeability status of the blood-brain barrier and in vitro permeability coefficient of a drug. Eur J Pharm Sci. 2000 Dec;12(2):95-102.

Abbott NJ, Dolman DE, Drndarski S, Fredriksson SM. An improved in vitro blood-brain barrier model: rat brain endothelial cells co-cultured with astrocytes. Methods Mol Biol. 2012;814:415-30.

Saunders NR, Habgood MD, Dziegielewska KM. Barrier mechanisms in the brain, II. Immature brain. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1999;26(2):85-91.

Saunders NR, Liddelow SA, Dziegielewska KM. Barrier mechanisms in the developing brain. Front Pharmacol. 2012;3:46.

- A 113. oldalon említett „részletes biokémiai vizsgálatok” kifejezéssel arra szerettem volna utalni, hogy tekintettel a korlátozott hozzáférhetőségre és a rendszer komplexitására, a vér-agy gát működésének biokémiai aspektusai nehezen vizsgálhatóak in vivo. A vér agy gát in vivo permeabilitásának vizsgálatára Evans-kéken és fluoreszceneken kívül gyakran használnak egyéb fluoreszcens molekulákat, mint például különböző molekulásúlyú fluoreszcens dextránokat, izotóppal jelölt anyagokat (szukróz), illetve az in situ perfúziós technikát. A vér-agy gát permeabilitása in vivo azonban olyan modern képalkotó eljárásokkal is nyomon követhető, mint a gadolinium kontrasztal elvégzett NMR vizsgálatok, és sikerrel alkalmaztak PET-et is a P-glikoprotein működésének vizsgálatára (Elsinga és mtsai., 2007). A permeabilitás a felszínhez közeli erekben nyomon követhető koponyablakon keresztül is intravitális mikroszkópia segítségével.

Elsinga PH, Hendrikse NH, Bart J, van Waarde A, Vaalburg W. Positron emission tomography studies on binding of central nervous system drugs and P-glycoprotein function in the rodent brain. *Mol Imaging Biol.* 2005 Jan-Feb;7(1):37-44.

- A bíráló hiányolja, hogy az Eredmények című fejezetben nem tüntettem fel, hogy az ismertetett eredmények melyik közleményben kerültek publikálásra. Mivel nem tézisszerű a disszertáció, az eredményekhez nem tettem referenciákat, de valóban átláthatóbb lett volna, ha az alcímek után feltüntettem a közleményt, amelyben az adatok megjelentek.

- A professzor asszony felteszi a kérdést, hogy mi az oka annak, hogy egyedülálló sejtekben több ZO-2 van a magban. Az egyedülálló sejtekben helyzetükből adódóan még nem alakultak ki sejt-sejt kapcsolatok, különösen nem zárókapcsolatok, amelyek a sejtek polarizáltságát is meghatározzák. Ebben a helyzetben a junkcionális fehérjék lokalizációja sem a megszokott, szoros kapcsolatokba lokalizálódó. A ZO-2 strukturális feladatai mellett fontos jeltovábbító funkcióval is rendelkezik, mely szabályozza többek között a sejtproliferációt. A ZO-2 a sejtciklus késői G1 fázisában vándorol a magba, a mitózis során pedig eltűnik belőle (Gonzalez-Mariscal és mtsai., 2012). Ez lehet az oka annak, hogy a ZO-2 az egymással kapcsolatot még nem kialakított, proliferáló sejtekben nagyobb mennyiségben fordul elő a magban, mint a nyugvó, barriert alkotó sejtekben.

Gonzalez-Mariscal L, Bautista P, Lechuga S, Quiros M. ZO-2, a tight junction scaffold protein involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Jun;1257:133-41.

- Mi az oka annak, hogy a magi ZO-2-t túlexpresszálo sejtekben a claudin-1 és az occludin diffúz citoplazmatikus festést mutat?

A magi ZO-2-t túlexpresszálo sejtek szoros kapcsolatai instabilabbak, ami funkcionális zavarokhoz is vezet: ezt jelzi az alacsonyabb transzepiteliális elektromos ellenállás. A gyengébb barrier tulajdonságok magyarázata abban rejlik, hogy az occludin illetve claudin-1 nem képes teljes mértékben a junkciókba lokalizálódni, így citoplazmatikus festés is megjelenik. Hogy milyen mechnizmus révén befolyásolja a magi ZO-2 az occludin és claudin-1 lokalizációját, ma még nem

ismeretes. Feltételezhető azonban, hogy a megnövekedett magi ZO-2 miatt a membránban kisebb a ZO-2 mennyisége. Géncsendesítés segítségével kimutatták, hogy a ZO-2 membránbeli hiánya rontja a szoros kapcsolatok gát és „kerítés” tulajdonságait, aminek hátterében az occludin és E-cadherin diszlokálizációja áll (Hernandez és mtsai., 2007).

Hernandez S, Chavez Munguia B, Gonzalez-Mariscal L. ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture. *Exp Cell Res.* 2007 May 1;313(8):1533-47

- A bíráló hiányolja a MEK rövidítés magyarázatát. Sajnos a MEK rövidítés magyarázata kimaradt. A MEK mitogén aktiválta protein kináz kináz (MAPKK), azaz a mitogén aktiválta protein kinázokat (elsősorban ERK1/2-t) foszforilálja, és innen ered angol neve is, amiből a rövidítés származik: MAPK/ERK kinase.

- Mik az élesztő kettős hibrid vizsgálatok, és hol végezték?

Az élesztő kettős hibrid módszer egy molekuláris biológiai módszer, amely alkalmas fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatására. A módszer lényege, hogy a vizsgálni kívánt fehérjét (csali fehérje) egy élesztő transzkripció faktor (GAL4) DNS kötő részéhez (DNS-BD) kapcsolják, ily módon egy fúziós fehérje fog a plazmidról termelődni. A potenciális kölcsönható fehérjéket (csuka-fehérjék) ugyanannak a transzkripció faktornak az aktiváló doménjéhez kapcsolják (az ilyen könyvtárak megvásárolhatóak, illetve az élesztő kettős hibrid kit részei). A GAL4 szabályozása alatt álló gén expressziója akkor fog megindulni, ha a csali fehérje és csuka fehérje kölcsönhatásban vannak, mert csak ebben az esetben kerül a DNS kötő domén és az aktivátor domén olyan olyan térbeli helyzetbe, amely hasonlít a teljes transzkripció faktorra. Az ily módon átíródó gén riporter génként szolgál. Az élesztő kettős hibrid kísérleteket az „Institute of Molecular Biology”-ban (Salzburg, Ausztria) kutatócsoportbeli kollégám végezte. Bár én is aktív résztvevője voltam a projektnek, ezt a konkrét kísérletet nem én végeztem el, ezért nem került a dolgozatba részletes bemutatása.

- A professzor asszony hiányolja, hogy nincs irodalmi hivatkozás a mannitol koncentráció klinikai gyakorlatban történő alkalmazásáról. Az irodalmi hivatkozás kimaradt, ezt ezúton szeretném pótolni: Kroll RA, Neuwelt EA. Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery.* 1998;42(5):1083-99; discussion 1099-100. Az ozmotikus vér-agy gát megnyitást intenzív terápiás körülmények között végzik agyi tumorok terápiájának elősegítésére egy nemzetközi konzorcium keretei között (International Blood-Brain Barrier (BBB) Consortium), amelynek vezető intézménye az Oregon Health Science University.

A mechanoreceptorok expressziójára vonatkozó kérdésre a következő választ adom. Számos tanulmány igazolja, hogy mechanikai hatásoknak, például a keringés által előidézett nyíró erőknek fontos szerepe lehet egyes endoteliális funkciók szabályozásában. Így például fokozódik a junkcionális

fehérjék expressziója, javulnak a barrier tulajdonságok, megváltoznak egyes sejtek letapadási tulajdonságai, illetve jelentős fehérje expressziós változások is megfigyelhetők (Cucullo és mtsai., 2011), azonban a mögöttük álló molekuláris mechanizmusok nem tisztázottak. Mechanoszenzitív csatorna áramokat sikerült mérni agyi endotélsejtekben (Chang és mtsai., 2011), amelyek expresszálnak TRPC1-et (Inoue és mtsai., 2009), TRPA1-et (Earley és mtsai., 2009) és TRPV1-et is (Golech és mtsai., 2004), amelyek ismeretes, hogy mechanoszenzitív tulajdonságokkal rendelkeznek. Ezek minden bizonnyal fontos szerepet játszanak a mechanikai ingerekre adott endoteliális reakciók mediálásában.

Kroll RA, Neuwelt EA. Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery*. 1998;42(5):1083-99; discussion 1099-100.
 Cucullo L, Hossain M, Puvenna V, Marchi N, Janigro D. The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology. *BMC Neurosci*. 2011;12:40.
 Chang X, Zeng Y, Yu H, Hu J. Mechanosensitive channel currents recorded in rat microvascular endothelial cells with whole-cell mode. *Technol Health Care*. 2001;9(5):427-32.
 Inoue R, Jian Z, Kawarabayashi Y. Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology. *Pharmacol Ther*. 2009;123(3):371-85.
 Earley S, Gonzales AL, Crnich R. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ channels. *Circ Res*. 2009 Apr 24;104(8):987-94.
 Golech SA, McCarron RM, Chen Y, Bembry J, Lenz F, Mechoulam R, Shohami E, Spatz M. Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004;132(1):87-92.

- Az endotélsejtek melyik felszínén helyezkednek el a glutamát receptorok?

A glutamát receptorok agyi endotélsejtekből történő kimutatására a legtöbb esetben RT-PCR, Western-blot esetleg immunfluoreszcens módszereket alkalmaztak, amelyek nem alkalmasak arra, hogy egyértelműen eldöntsék azt a kérdést, hogy a lumenális vagy ablumenális oldalon helyezkednek-e el a receptorok. A kísérleti adatok arra utalnak, hogy a receptorok mindkét oldalon előfordulhatnak. Lumenális glutamát kezelés az agyi endoteliális occludin expressziójának csökkenéséhez vezet (András és mtsai., 2007), ugyanakkor ablumenálisan adott NMDA antagonisták csökkentette a monocita transzmigrációt (Reijerkerk és mtsai., 2010). A nagyobb mennyiségű lumenális glutamát receptor jelenléte ellen szól, hogy a plazma glutamát koncentrációja (~30 µM) (Divino Filho és mtsai., 1998) sokkal nagyobb, mint az agyi extracelluláris téré (Herman és Jahr, 2007), így a lumenális receptorok állandó stimulálás alatt lennének.

András IE, Deli MA, Veszelka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 Aug;27(8):1431-43.
 Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, Leyen T, Lakeman K, van Het Hof B, Vivien D, de Vries HE. The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. *J Neurochem*. 2010;113(2):447-53.
 Divino Filho JC, Hazel SJ, Fürst P, Bergström J, Hall K. Glutamate concentration in plasma, erythrocyte and muscle in relation to plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-1 and insulin in patients on haemodialysis. *J Endocrinol*. 1998 Mar;156(3):519-27.
 Herman MA, Jahr CE. Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *J Neurosci*. 2007 Sep 5;27(36):9736-41.

- A 109. oldal utolsó mondata valóban nem a legszerencsésebben van megfogalmazva: arra szerettem volna rámutatni, hogy a cAMP szabályozhatja a vér-agy gát permeabilitását. A nem világos megfogalmazásért elnézést kérek.

Végezetül szeretném még egyszer megköszönni Dr. Matesz Klára professzor asszonynak a bírálatot és a támogató véleményét. Tisztelettel kérem, hogy észrevételeire és kérdéseire adott válaszaimat szíveskedjék elfogadni.

Tisztelettel,

Szeged, 2013. január 7.

Krizbai István